



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

| | | |
|--|-----------|---|
| (51) Classification internationale des brevets ⁵ : G01N 27/447 | A2 | (11) Numéro de publication internationale: WO 92/13229 (43) Date de publication internationale: 6 août 1992 (06.08.92) |
| (21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/00011 (22) Date de dépôt international: 8 janvier 1992 (08.01.92) (30) Données relatives à la priorité: 91/00144 8 janvier 1991 (08.01.91) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): EURO-PHOR S.A. [FR/FR]; Parc Technologique du Canal, 10, avenue de l'Europe, F-31520 Ramonville-Toulouse (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): HERNANDEZ, Luis [FR/FR]; 12, rue de Tananarive, F-31200 Toulouse (FR). (74) Mandataires: ROGER-PETIT, Georges etc.; Office Blétry, 2, boulevard de Strasbourg, F-75010 Paris (FR). | | (81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), MC (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US. Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i> |
| (54) Titre: ANALYSIS METHOD BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS WITH FLUORESCENCE DETECTION. | | |
| (54) Titre: PROCEDE D'ANALYSE PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE AVEC DETECTION PAR FLUORESCENCE. | | |
| | | |
| (57) Abstract <p>In the analysis method by capillary electrophoresis with fluorescence detection, a sample containing the product to be analyzed marked with a fluorescent agent is passed into an electrophoresis capillary having an inner diameter not exceeding to 100 μm, a laser beam focussed onto the capillary by means of a light concentration device is used to stimulate fluorescence, and the fluorescence is detected in a colinear manner, in the axis illuminated by the laser beam and on the same side of the capillary, by means of the light concentration device used to focus the laser beam and a photodetector. The method provides for a large variety of applications, particularly in molecular biology and in the pharmaceutical field as well as in the determination of traces of ions.</p> (57) Abrégé <p>Procédé d'analyse par électrophorèse capillaire avec détection par fluorescence, dans lequel on fait passer dans un capillaire d'électrophorèse de diamètre intérieur inférieur ou égal à 100 μm un échantillon contenant les produits à analyser marqués au besoin par un agent de fluorescence. On utilise pour exciter la fluorescence un faisceau laser focalisé sur le capillaire par un dispositif de concentration de la lumière et on détecte la fluorescence de manière colinéaire, soit dans l'axe d'illumination par le faisceau laser et du même côté du capillaire, à l'aide du dispositif de concentration de la lumière utilisé pour focaliser le faisceau laser et d'un photodétecteur. Ce procédé permet un grand nombre d'applications, notamment en biologie moléculaire et dans le domaine pharmaceutique, ainsi que pour l'analyse de traces d'ions.</p> | | |

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | |
|----|---------------------------|----|--|----|-----------------------|
| AT | Autriche | ES | Espagne | MG | Madagascar |
| AU | Australie | FI | Finlande | ML | Mali |
| BB | Barbade | FR | France | MN | Mongolie |
| BE | Belgique | GA | Gabon | MR | Mauritanie |
| BF | Burkina Faso | GB | Royaume-Uni | MW | Malawi |
| BG | Bulgarie | GN | Guinée | NL | Pays-Bas |
| BJ | Bénin | GR | Grèce | NO | Norvège |
| BR | Brazil | HU | Hongrie | PL | Pologne |
| CA | Canada | IT | Italie | RO | Roumanie |
| CF | République centrafricaine | JP | Japon | RU | Fédération de Russie |
| CG | Congo | KP | République populaire démocratique de Corée | SD | Soudan |
| CH | Suisse | KR | République de Corée | SE | Suède |
| CI | Côte d'Ivoire | LI | Liechtenstein | SN | Sénégal |
| CM | Cameroon | LK | Sri Lanka | SU | Union soviétique |
| CS | Tchécoslovaquie | LU | Luxembourg | TD | Tchad |
| DE | Allemagne | MC | Monaco | TG | Togo |
| DK | Danemark | | | US | Etats-Unis d'Amérique |

Procédé d'analyse par électrophorèse capillaire avec
détection par fluorescence.

L'invention concerne un procédé d'analyse par
électrophorèse capillaire avec détection par
fluorescence, et ses applications.

5 L'électrophorèse capillaire est une technique de
séparation puissante qui permet de détecter la présence
de très faibles quantités de substances dans des zones
de détection de très faible volume [cf. J. W. Jorgenson
and K. D. Lukacs, Anal. Chem. 53, 1298-1302, 1981 et M.
A. Guzman, L. Hernandez and P. G. Hoebel, Biopharm.
10 Manuf., 2 (1989), 22]. La migration électrophorétique se
fait dans un capillaire rempli d'un tampon
essentiellement aqueux ou dans un capillaire garni de
gel, les substances étant dissoutes dans une solution
tamponnée.

15 Plusieurs modes de détection (spectrométrie UV,
ampérométrie, conductométrie,...) peuvent être utilisés
[W. G. Kuhr, Anal. Chem. 62, 1990 (403-R)] mais la
détection par fluorescence s'est révélée être
particulièrement sensible [R. T. Kennedy, M. D. Oates,
20 B. R. Cooper, B. Nickerson and J. W. Jorgenson, Science,
246 (1989) 57]. La fluorescence est la propriété que
possèdent certaines substances d'émettre, lorsqu'elles
sont excitées par une lumière d'une certaine longueur
d'onde, un rayonnement de longueur d'onde supérieure à
25 celle des rayons incidents. Les substances qui ne
possèdent pas de fluorescence naturelle peuvent
toutefois être détectées si elles ont préalablement été
marquées par un agent de fluorescence, par exemple la
fluoresceine pour n'en citer qu'un.

La sensibilité de la détection par fluorescence vient du fait que l'émission de fond (hors fluorescence) est faible de sorte qu'il se produit un changement important de l'émission provenant soit de fluorochromes soit de fluorescence native. Ceci contraste avec les phénomènes classiques d'absorption en UV ou en visible où la différence d'absorption entre la solution tamponnée et le produit analysé est faible. En outre du fait de l'existence de deux longueurs d'onde précises (énergie d'excitation et énergie d'émission), la selectivité de la détection est élevée.

Toutefois pour certaines applications comme les recherches de traces au sein d'échantillons biologiques et le séquençage d'ADN, il est souhaitable de pouvoir encore améliorer la sensibilité, la vitesse et la selectivité de l'analyse. Cette amélioration de sensibilité permet dans certains cas d'analyse de fragments d'ADN d'éviter d'utiliser la technique PCR (Polymerase Chain Reaction: amplification en chaîne par réaction) qui donne de bons résultats mais au prix d'une augmentation de la complexité de l'analyse. Il a été suggéré d'utiliser un faisceau laser pour exciter la fluorescence, ainsi FR-A- 2 558 262 décrit l'utilisation d'un faisceau laser pour l'analyse par électrophorèse classique de fragments d'ADN.

Dans tous les systèmes de détection par fluorescence utilisés avec l'électrophorèse capillaire, la fluorescence est recueillie soit dans le prolongement des rayons incidents soit orthogonalement (cf. FR-A- 2 558 262 ainsi que E. K. Gassmann, J. E. Kuo and R. Zare, Science, 230 (1985), 813; B. Nickerson and G. W. Jorgenson, J. High Res., 11, (1988), 533; et Y. F. Cheng and W. J. Dovich, Science, 242 (1988), 5621. Il est donc nécessaire d'utiliser deux systèmes optiques, l'un pour focaliser les rayons incidents sur le capillaire et l'autre pour recueillir la lumière émise

et la focaliser sur un tube photomultiplicateur par exemple.

Pour des raisons d'encombrement spatial, en particulier dans les montages orthogonaux, il n'est pas possible de placer les systèmes optiques très près du capillaire et la distance qui les sépare de celui-ci est de l'ordre de 1 cm, avec pour inconvénients principaux une faible collecte de la lumière émise en fluorescence alors qu'on recueille en plus la lumière produite par les diffusions Raman et Rayleigh, d'où un rapport signal/bruit faible. Les fibres optiques qui sont parfois utilisées permettent d'approcher du capillaire mais on constate qu'elles ne donnent pas une bonne sensibilité ($10^{-7}M$ environ) (E. K. Gassmann et al, Science, op. cit. et US-A- 4 675 300).

L'invention remédie à ces inconvénients en fournissant un procédé d'analyse par électrophorèse capillaire avec détection de fluorescence, dans lequel

on fait passer dans un capillaire d'électrophorèse de diamètre intérieur inférieur ou égal à 100 μm un échantillon contenant les produits à analyser marqués au besoin par un agent de fluorescence,

on utilise un faisceau laser focalisé sur le capillaire à l'aide d'un dispositif de concentration de la lumière pour exciter la fluorescence, et

on détecte la fluorescence de façon colinéaire, à l'aide du dispositif de concentration utilisé pour focaliser le faisceau laser et d'un photodétecteur.

L'expression "de façon colinéaire" signifie que la détection de la lumière émise se fait dans l'axe d'illumination et du même côté du capillaire.

Les expériences effectuées montrent de façon inattendue qu'il est possible d'obtenir une sensibilité de détection bien meilleure qu'en utilisant un laser avec un montage orthogonal. En effet il s'avère que les limites de détection en concentration sont de $10^{-13}M$ à

10⁻¹⁴M et celles de détection en masse sont de 60 à 200 molécules dans le capillaire, en fonction du produit détecté. Le fluorescéine-thiocyanate, utilisé de manière classique comme étalon de référence, a même été
5 détecté à 6 x 10⁻¹⁵M, ce qui correspond à peu près au passage de 4 molécules dans le capillaire. On atteint donc les limites de détection physiques. Les autres systèmes de détection basés sur des systèmes orthogonaux ont des sensibilités de 3 ordres de grandeur (1000 fois)
10 plus faibles que celui basé sur un arrangement colinéaire selon l'invention. Dans E. K. Gassmann et al, Science, op. cit., elle est de 10⁻⁸ M; dans B. Nickerson and G. W. Jorgenson, J. High Res., op. cit., elle est de 10⁻¹⁰ M; et H. Swerdlow and R. Gesteland, Nucleic Acid
15 Research, 18 (1990) 1415 donnent une valeur de 10⁻¹¹ M.

Par ailleurs on sait que le fait d'utiliser des capillaires de faible diamètre intérieur permet certes une plus grande vitesse d'analyse d'un mélange de produits, propriété intéressante dans beaucoup
20 d'applications comme le contrôle qualité ou le séquençage d'ADN, mais la sensibilité est alors réduite du fait des difficultés de collecte du rayonnement incident provenant du capillaire et surtout de la faible quantité détectable. C'est pourquoi les capillaires
25 utilisés jusqu'ici ont un diamètre interne d'au moins 75 µm ou 100 µm pour conserver une bonne sensibilité, alors que les résultats selon la présente invention ont été obtenus avec des capillaires de 50 µm, de 25 µm ou même de moins de 10 µm de diamètre intérieur, car il est
30 possible d'avoir une ouverture numérique élevée du fait que le dispositif de concentration est très proche du capillaire et que le point d'impact du faisceau laser permet une diminution du diamètre du capillaire sans que la sensibilité n'en pâtisse.

35 En outre, l'utilisation de tubes capillaires avec un diamètre interne aussi faible que possible est très

souhaitable en électrophorèse capillaire car l'efficacité de séparation obtenue est nettement supérieure avec les capillaires de plus petit diamètre. Ceci est principalement dû au fait que l'élargissement des bandes en électrophorèse capillaire est en grande partie dû à la convection thermique créée par effet Joule à l'intérieur du capillaire quand un courant électrique passe dans le capillaire. Selon la loi d'Ohm, la quantité de chaleur due à l'effet Joule produite à l'intérieur du capillaire est directement proportionnelle au diamètre interne du tube capillaire, ainsi plus faible est le diamètre du tube, plus faible est l'échauffement, donc plus grande est l'efficacité de séparation.

Selon la présente invention, il est possible de travailler avec des capillaires d'un diamètre interne pouvant descendre jusqu'à 5 à 25 μm car l'élément optique utilisé pour la focalisation de la lumière d'excitation et la collecte de la fluorescence émise peut avoir une ouverture numérique élevée permettant un placement très proche par rapport au capillaire, comme indiqué précédemment, de sorte que la sensibilité ne diminue pas.

Il semble que les performances étonnantes du procédé selon l'invention proviennent de la combinaison des raisons suivantes :

- la fluorescence est détectée du côté de l'échantillon qui est excité, donc là où elle est la plus intense,
- elle est détectée dans l'axe où les diffusions Raman et Rayleigh sont les plus faibles, ce qui augmente le rapport signal/bruit,
- la lumière émise peut être recueillie avec des lentilles optiques avant une distance focale de moins de 1 mm, par exemple 330 μm , (au lieu de la valeur d'environ 1 cm imposée par les montages orthogonaux) et

une plus grande ouverture numérique, ce qui améliore le signal reçu.

L'utilisation d'un seul dispositif optique et donc d'un seul système de déplacement XYZ pour focaliser la lumière incidente sur le capillaire et simultanément concentrer la lumière émise sur le dispositif de collecte est avantageuse tant du point de vue de la structure simplifiée du dispositif complet que de la limitation des manipulations à effectuer.

Il est en outre à noter que le dispositif complet selon la présente invention occupe un espace de l'ordre de 30 x 10 cm alors que ceux de la technique antérieure ont un encombrement important, par exemple celui décrit dans S. Wu and M. J. Dovichi, J. Chrom. 480 (1989), 141 qui constitue un banc optique de 120 x 180 cm.

Un dispositif de mise en oeuvre du procédé décrit ci-dessus, comprend une source de rayon laser, un diviseur de faisceau envoyant le faisceau laser à travers un dispositif optique de concentration sur un capillaire d'électrophorèse de diamètre intérieur inférieur ou égal à 100 μ m, un filtre passe-haut ne laissant passer que la lumière due à la fluorescence vers un photodétecteur qui est situé dans l'axe du faisceau incident en amont du diviseur de faisceau par rapport au faisceau incident.

En dehors de l'analyse d'acides aminés marqués par des composés fluorescents qui est effectuée de manière classique par la technique d'électrophorèse capillaire à détection par fluorescence, le procédé selon la présente invention permet de réaliser, en raison de sa très grande sensibilité, des analyses qui n'ont jusqu'à présent pas été réalisées par cette technique associant l'électrophorèse capillaire et la détection par fluorescence. On citera par exemple dans les domaines de la biologie moléculaire l'analyse de peptides marqués par des composés fluorescents, l'analyse de matériel génétique, la recherche et le dosage de composés

spécifiques permettant un diagnostic médical tant chez l'homme que chez l'animal, les analyses de contrôle de qualité de produits pharmaceutiques (degré de pureté, produits de dégradation, stabilité des ingrédients actifs et des excipients), la détermination de paramètres pharmacocinétiques, l'identification et le dosage de métabolites obtenus à partir de médicaments dans des échantillons biologiques, etc..., et même l'analyse d'ions (amines et/ou cations) par utilisation d'une détection indirecte de la fluorescence. De telles applications seront décrites plus en détail dans les exemples qui suivent.

L'invention va maintenant être décrite plus en détail en référence aux dessins annexés dans lesquels :

la figure 1 est une représentation schématique d'un dispositif de mise en oeuvre du procédé selon l'invention,

la figure 2 est une représentation schématique d'un autre mode de mise en oeuvre du procédé selon l'invention, utilisant un détecteur de la fluorescence émise différent,

les figures 3a et 3b sont respectivement des schémas montrant les principaux sens d'émission de la fluorescence et des diffusions Raman et Rayleigh,

les figures 4a et 4b illustrent l'impact du faisceau laser sur le capillaire.

les figures 5a à 5d sont des exemples des électrophorogrammes obtenus pour différents acides aminés,

la figure 6 illustre la détection d'un nonapeptide (bradykinine),

la figure 7 illustre l'analyse de matériel génétique,

la figure 8 illustre la détection de la substance P, hormone largement répandue chez les mammifères.

les figures 9a et 9b montrent la détection d'un antibiotique et de ses produits de dégradation à partir d'un échantillon dans l'eau et dans l'urine,

la figure 10 illustre l'analyse d'ions utilisant la détection par fluorescence indirecte.

Un tube capillaire 1 d'électrophorèse, d'un diamètre intérieur inférieur ou égal à 100 μm , par exemple de 50 μm ou 25 μm ou même de 5 μm , est monté de manière classique aux bornes d'une source 2 d'énergie haute tension (de 0 à 30 kV, et de 0 à 300 μA).

Une source 3 de rayon laser envoie un faisceau laser 4 sur un diviseur chromatique 5 de faisceau qui dirige le faisceau 4 dans un dispositif optique de concentration de la lumière 6, qui focalise le faisceau 4 sur la zone de détection du capillaire 1. Le diviseur chromatique 5 est choisi de façon à réfléchir la lumière ayant la longueur d'onde d'excitation de la fluorescence et à laisser passer la lumière de longueur d'onde supérieure correspondant à la fluorescence. La lumière émise par fluorescence recueillie par le dispositif optique 6 (par exemple une lentille ou un système de lentilles) traverse le diviseur chromatique 5 et va frapper un photodétecteur 7. Entre le diviseur 5 et le photodétecteur 7, on place avantageusement un filtre passe-haut 8 à longueur d'onde de coupure légèrement supérieure à la longueur d'onde de coupure du diviseur chromatique pour achever d'éliminer la lumière ne correspondant pas à la fluorescence et un filtre d'interférence 9 pour éliminer la lumière résiduelle provenant du laser.

Le choix de la longueur d'onde du faisceau laser et des longueurs d'onde de coupure des éléments 5 et 8 est bien entendu fonction de la fluorescence à détecter. On peut toutefois mentionner que pour l'analyse des acides aminés qui se fait avec transformation des composés à rechercher en dérivés de fluorescéine, on utilise

avantageusement un laser à l'ion argon refroidi à l'air dont on isole la raie à 488 nm que l'on envoie sur un miroir dichroïque (diviseur de faisceau) qui réfléchit les longueurs d'onde inférieures à 510 nm, avec un
5 filtre passe-haut de 520 nm. Un système de lentilles de grossissement 40x et ayant une ouverture numérique de 0,75 focalise le faisceau laser sur un capillaire en silice fondue de 25 μm de diamètre intérieur par exemple. Le faisceau laser utilisé a un impact de 5 μm
10 sur le capillaire, ce qui permet d'utiliser des capillaires dont le diamètre intérieur peut descendre jusqu'à 5 μm . Le capillaire peut contenir un tampon ou être garni de gel.

Le photodétecteur est un tube photomultiplicateur
15 relié à un convertisseur 10 intensité-tension dont le signal de sortie est transmis à travers un filtre 11 à un enregistreur à papier 12 (figure 1).

On a constaté lors d'essais avec des capillaires très fins (5 μm) que l'on obtient des vitesses d'analyse
20 importantes sans que la sensibilité n'en pâtisse. De ce fait il apparaît comme tout à fait approprié d'utiliser cette technique à la place de l'électrophorèse classique sur plaques pour le séquençage d'ADN ou de protéines.

Comme photodétecteur, on peut également utiliser un
25 dispositif à couplage de charge (CCD) dont on sait qu'il peut suivre simultanément plusieurs radiations d'émission, donc plusieurs fluorophores. Ceci est très avantageux lors du séquençage d'ADN qui libère quatre bases auxquelles on peut associer quatre fluorophores
30 différents. Dans ce cas, après le filtre passe-haut 8, est placé un polychromateur 20, une tête de caméra 21, son électronique associée 22 qui est reliée à un dispositif de visualisation et d'enregistrement 24, ainsi qu'à un ordinateur (figure 2). Le fonctionnement
35 d'un tel dispositif tel qu'appliqué à l'électrophorèse capillaire avec détection de fluorescence en montage

orthogonal est décrit par Yung-Fong Cheng et al dans Applied Spectroscopy 44, n°5 (1990) p.755-765. Mais la sensibilité obtenue n'est que 10^{-11} M, à comparer avec les résultats selon la présente invention.

5 Les figures 3a et 3b montrent respectivement l'émission de fluorescence 16 pour la zone excitée 15, et les émissions Raman et Rayleigh: intensité moyenne orthogonalement, flèches 17; intensité forte, flèches 18; et intensité faible dans la direction de la fluorescence, flèches 19.

10 Les figures 4a et 4b montrent l'impact d'un faisceau laser sur des capillaires de diamètre intérieur de 75 μ m et 25 μ m respectivement. On voit que pour une même longueur de capillaire de 10 mm, la quantité détectable est d'autant plus faible que le diamètre intérieur est faible. Il importe donc d'avoir un point d'impact très localisé tout en préservant la qualité de la détection.

Exemples d'application

Exemple 1

20 On analyse des échantillons contenant de la phénylalanine 5×10^{-12} M, de l'arginine 10^{-12} M, de la cystéine $8,25 \times 10^{-11}$ M et de la glycine $1,3 \times 10^{-12}$ M en utilisant le dispositif décrit ci-dessus avec un capillaire de 25 μ m, on obtient des enregistrements sur papier dont les figures 5a à 5d sont des reproductions.

Exemple 2

30 On fait réagir de la bradykinine (un nonapeptide de formule Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) avec du fluoresceine-isothiocyanate à l'extrémité amino à une concentration de 7×10^{-3} M dans un tampon borate 50 mM pH9, on l'introduit dans un tube capillaire de 60 cm de longueur et 75 μ m de diamètre monté dans le dispositif décrit précédemment et on applique une tension élevée (environ 30 kV). La figure 6 est une reproduction de l'enregistrement sur papier obtenu, le pic correspondant
35 à la bradykinine étant indiqué par une flèche.

Exemple 3

Dans cet exemple, on monte dans le dispositif un capillaire de 40 cm de longueur et de 50 μ m de diamètre rempli d'un gel de polyacrylamide. Une petite portion
5 d'un échantillon de matériel génétique est introduite dans le capillaire en solution dans du tampon 1 X TBE, par injection électrocinétique. La durée de l'injection est de 5 secondes et la tension appliquée est de 200 V/cm. Comme le montre la figure 7 qui reproduit
10 l'enregistrement sur papier obtenu, un oligonucléotide 21-mer à une concentration de 10^{-11} M est nettement séparé de ses voisins les plus proches 20-mer et 22-mer.

Exemple 4

15 Ceci est un exemple illustratif de ce que la présente technique permet de réaliser en matière de diagnostic médical et vétérinaire.

La substance P est une hormone largement répandue chez les mammifères et sa concentration dans les fluides
20 biologiques permet certains diagnostics. Ici le fluide biologique examiné est un dialysat prélevé par une sonde de microdialyse placée dans la substantia nigra (striatum) d'un rat. D'une manière similaire à celle utilisée dans l'exemple 2, la substance P est marquée au
25 fluorescéine-isocyanate et est ensuite analysée dans un capillaire de 50 cm de longueur et 75 μ m de diamètre dans un tampon de borate 50 mM pH9 sous une tension de 20 kV. La figure 8 est une reproduction de l'enregistrement sur papier obtenu.

Exemple 5

30 Le procédé d'analyse selon la présente invention permet d'analyser le degré de pureté, les produits de dégradation et la stabilité de produits pharmaceutiques, ici d'un antibiotique.

35 On analyse une solution d'ampicilline dans de l'eau en marquant l'ampicilline comme décrit dans l'exemple 2.

La figure 9a est une reproduction de l'enregistrement sur papier obtenu montrant la présence d'ampicilline (1) et de produits de dégradation et/ou d'impuretés de synthèse (2) en plus faibles quantités.

5 La même technique peut s'appliquer à des études pharmacocinetiques, par analyse d'échantillons d'urine ou d'autres fluides biologiques.

La figure 9b illustre l'analyse ainsi faite de l'ampicilline dans un échantillon d'urine, où 1 désigne l'ampicilline, 2 les métabolites et 3 les produits inconnus.

Dans les deux cas (figure 9a et figure 9b), les identifications des différents produits sont faites par comparaison de témoin blanc (eau ou urine), de réactif de marquage témoin et dans le cas d'une étude pharmacocinétique, d'urine au temps zéro (avant administration de l'ampicilline).

Exemple 6

On analyse une solution aqueuse contenant les anions suivants Br^- , Cl^- , SO_4^{2-} , NO_2^- , NO_3^- , F^- et CO_3^{2-} en faisant passer cette solution dans un capillaire contenant un tampon ayant une concentration d'environ 10^{-4}M de fluoresceïne, ce tampon fournissant une fluorescence permanente seulement interrompue par le passage des ions non fluorescents.

La figure 10 reproduit l'enregistrement sur papier obtenu, montrant une séparation nette des différents anions, à des concentrations aussi faibles que 10^{-9}M .

Les exemples précédents ont été donnés à titre illustratif des applications possibles de la présente invention, applications qui n'avaient jamais été envisagées pour la combinaison électrophorèse capillaire - détection par fluorescence et qui ne sont réalisables en pratique que grâce à l'utilisation du procédé et du

dispositif utilisant un capillaire d'électrophorèse de moins de 100 μm , une illumination par laser et une détection colinéaire de la fluorescence.

REVENDICATIONS

1.- Procédé d'analyse par électrophorèse capillaire avec détection par fluorescence, dans lequel

5 on fait passer dans un capillaire d'électrophorèse de diamètre intérieur inférieur ou égal à 100 μ m un échantillon contenant les produits à analyser marqués au besoin par un agent de fluorescence,

on utilise pour exciter la fluorescence un faisceau laser focalisé sur le capillaire par un dispositif de concentration de la lumière et

10 on détecte la fluorescence de manière colinéaire, soit dans l'axe d'illumination par le faisceau laser et du même côté du capillaire, à l'aide du dispositif de concentration de la lumière utilisé pour focaliser le faisceau laser et d'un photodétecteur.

15 2.- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le capillaire est garni de gel.

3.- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le capillaire est rempli d'un tampon.

20 4.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le photodétecteur est un tube photomultiplicateur.

5.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le photodétecteur est un dispositif à couplage de charge.

25 6.- Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, pour la recherche de substances naturelles dans les fluides biologiques.

7.- Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, pour des études pharmacocinétiques ou de qualité de produits pharmaceutiques.

5 8.- Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, pour le séquençage d'ADN.

9.- Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, pour l'analyse d'ions.

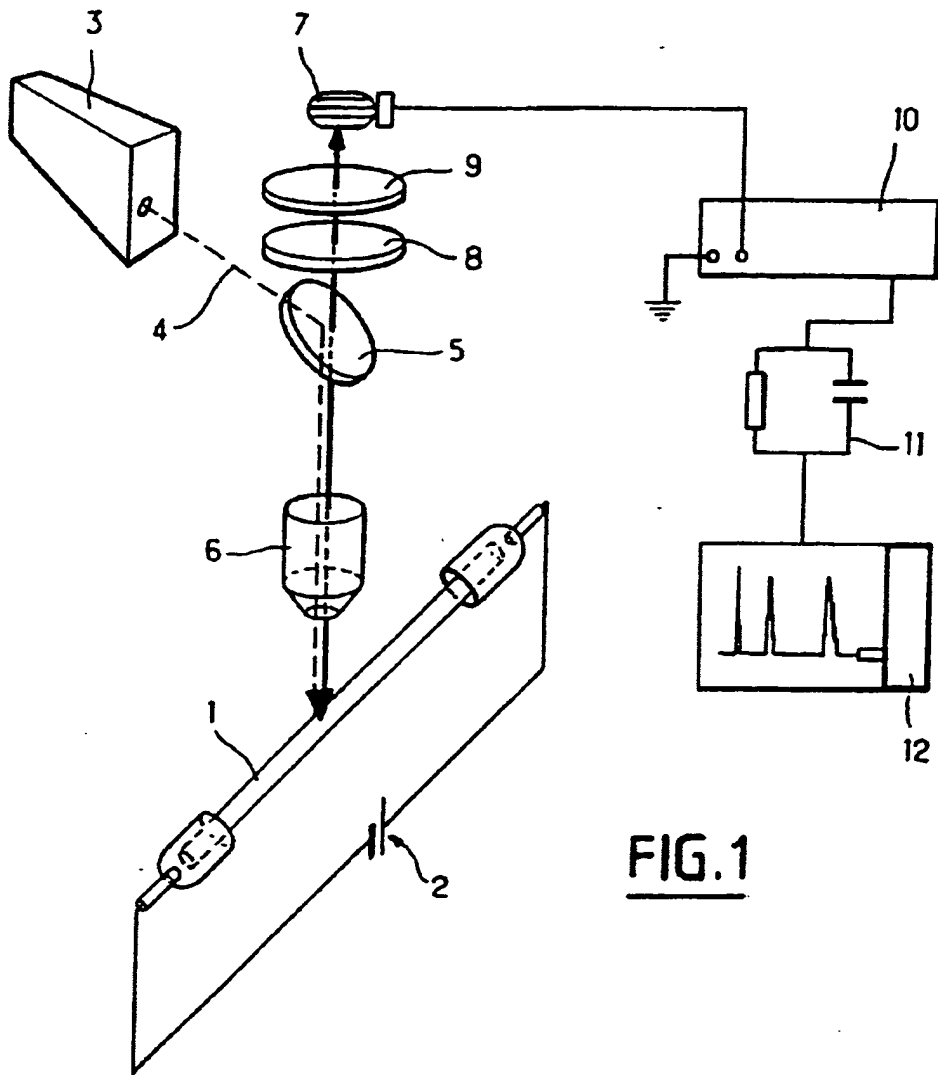


FIG. 1

FIG. 4a

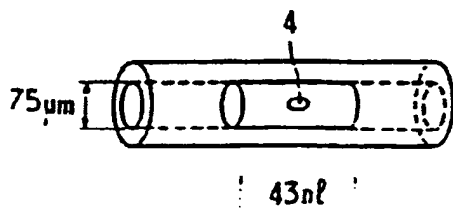
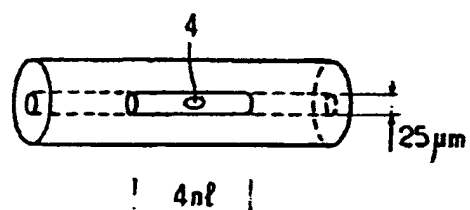
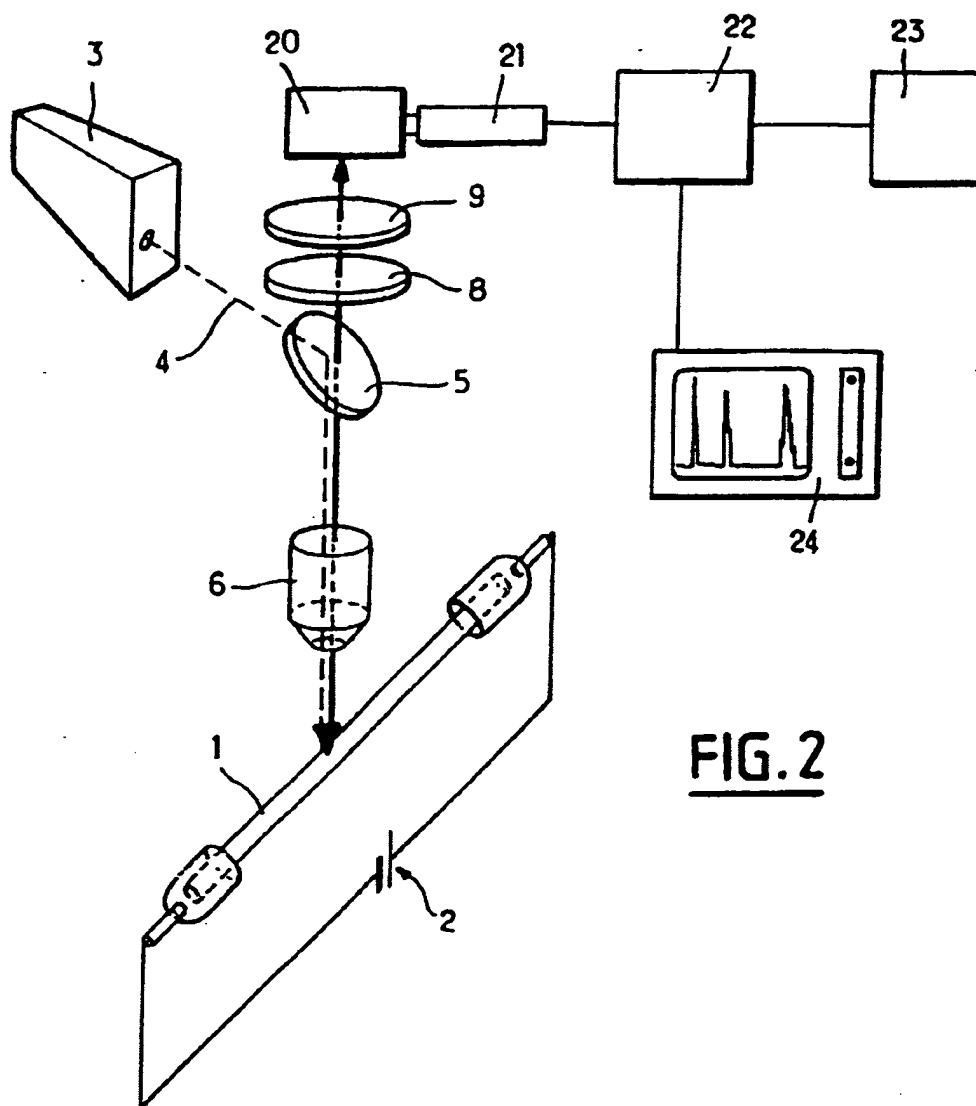
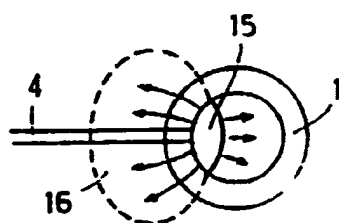
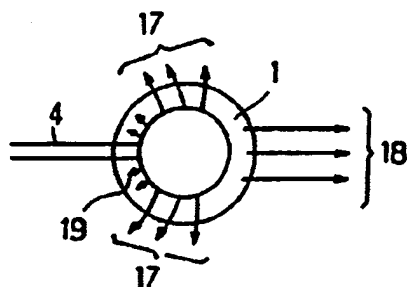


FIG. 4b



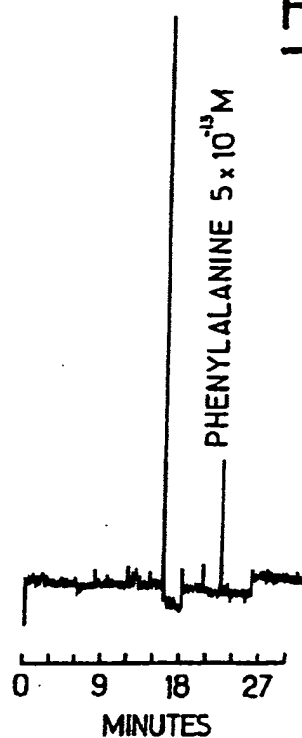
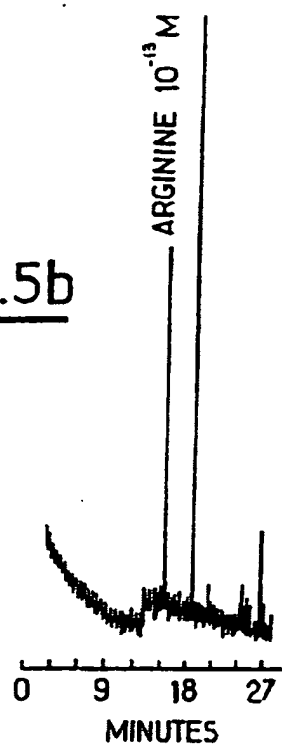
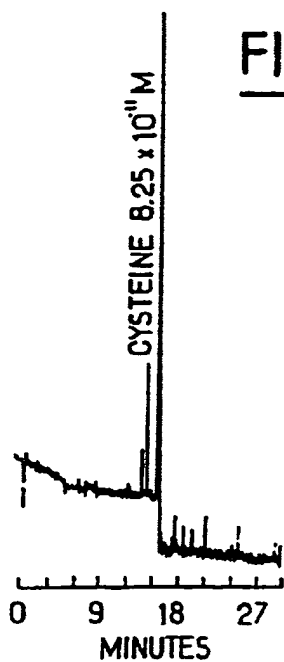
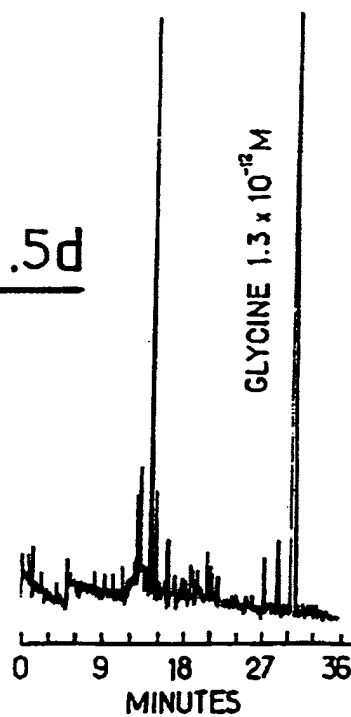
FEUILLE DE REMPLACEMENT

2 / 6

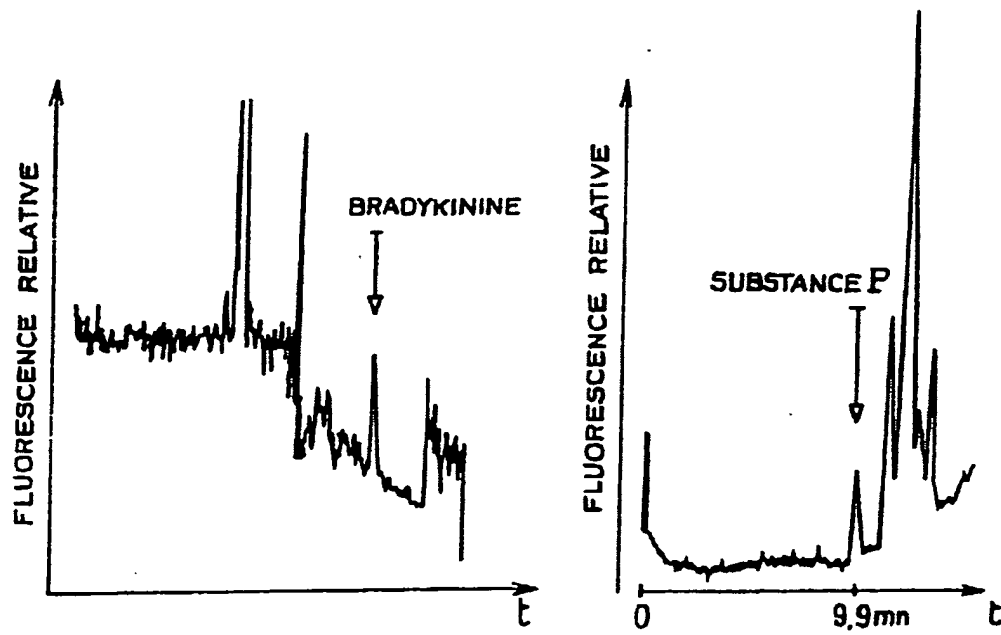
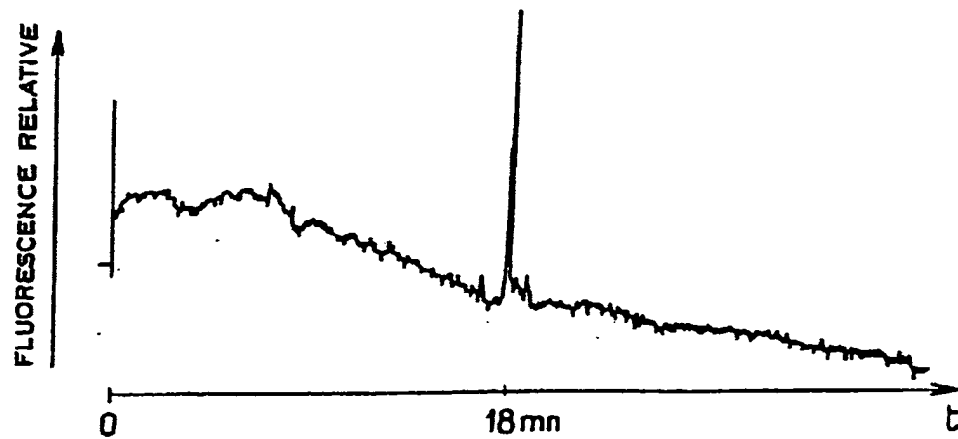
FIG. 2FIG. 3aFIG. 3b

FEUILLE DE REMPLACEMENT

3 / 6

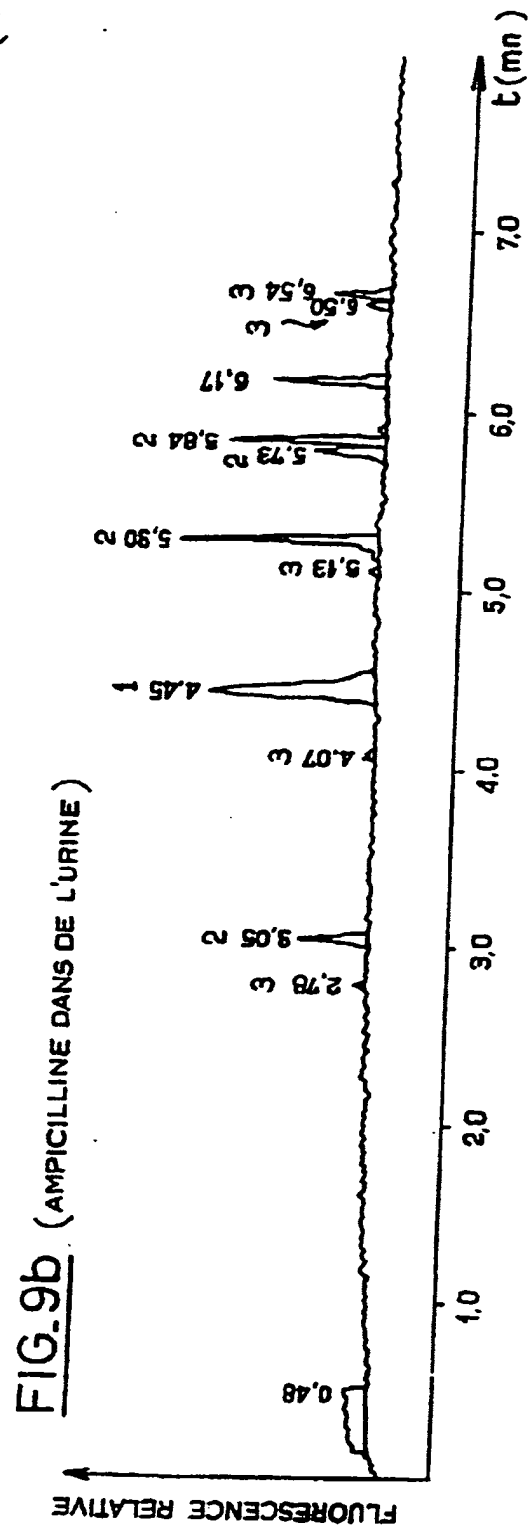
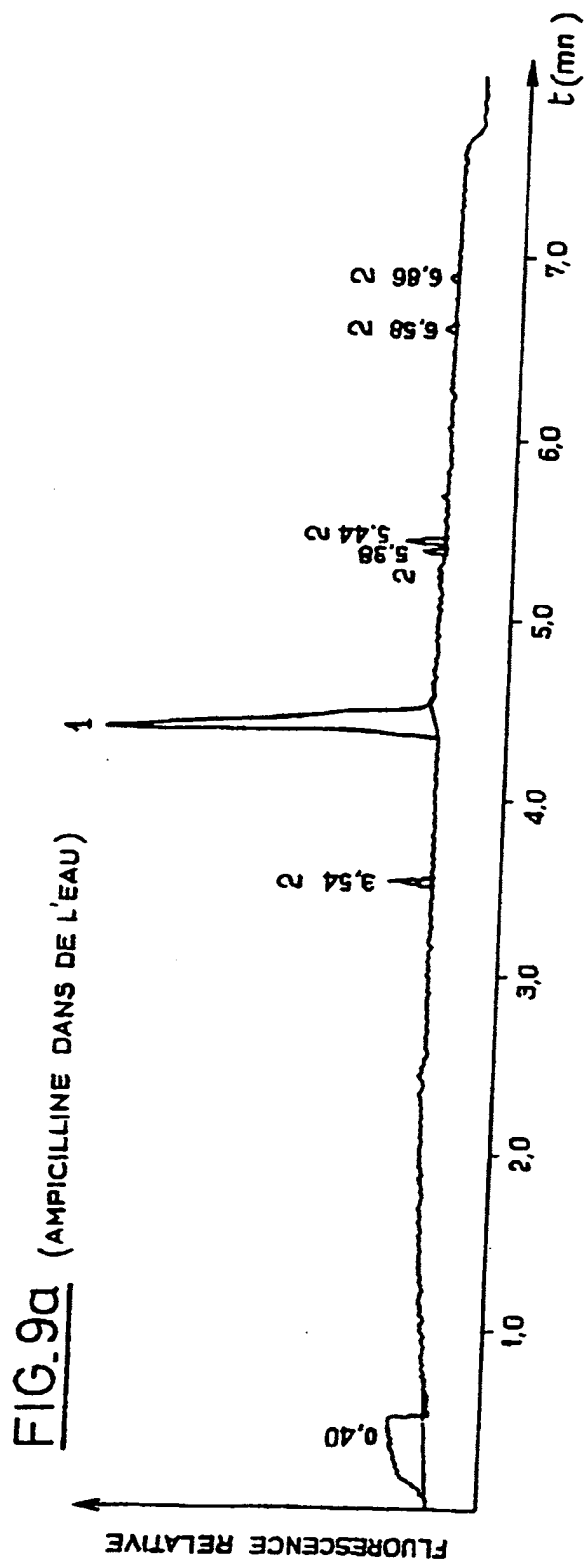
FIG. 5aFIG. 5bFIG. 5cFIG. 5d

FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIG. 6FIG. 8FIG. 7

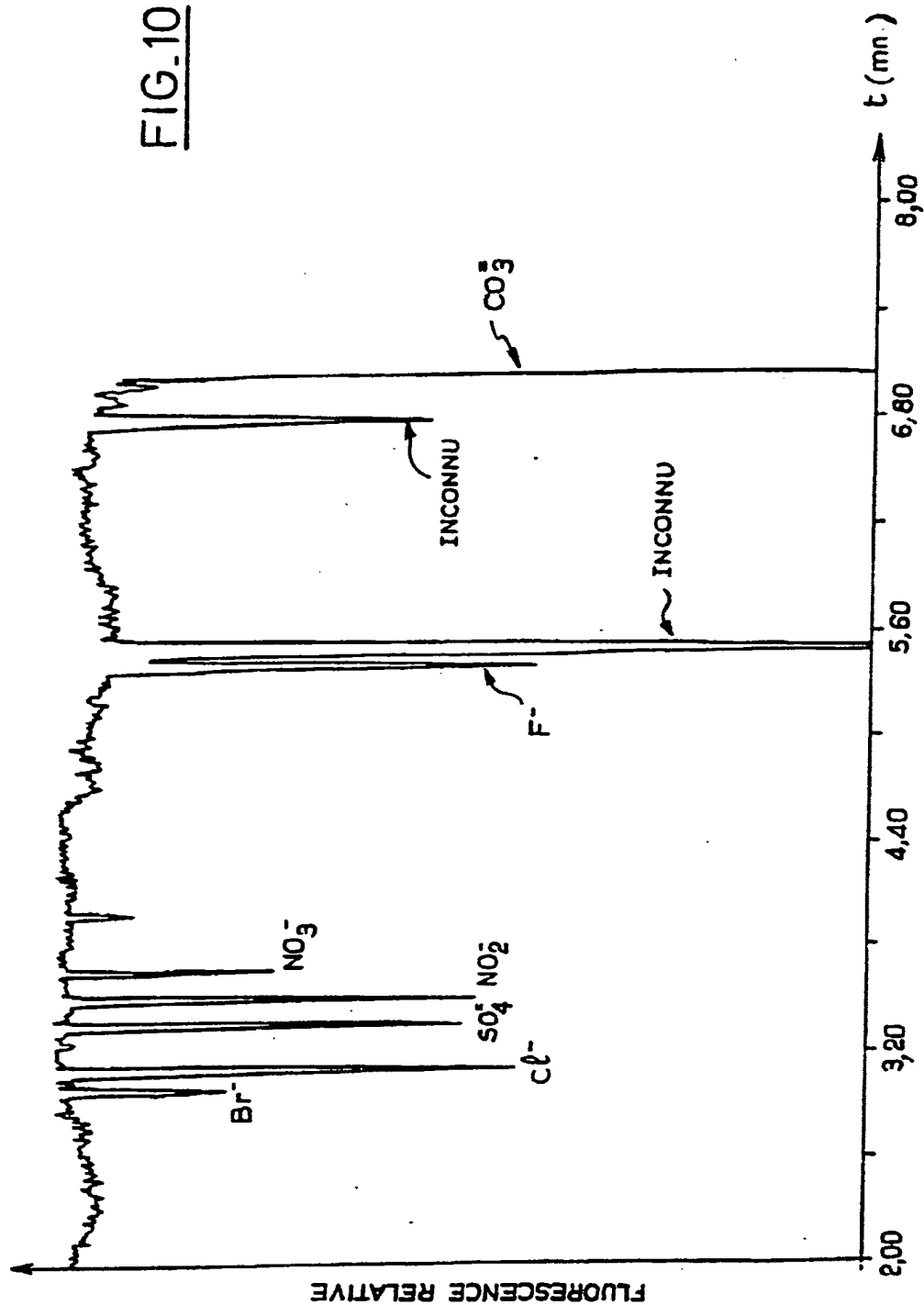
FEUILLE DE REMPLACEMENT

5 / 6



FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIG. 10



FEUILLE DE REMPLACEMENT